



BÜHLMANN fCAL[®] ELISA

Kalprotektin ELISA

For *In Vitro*-diagnostisk bruk.

EK-CAL	96 tester
EK-CAL2	192 tester

Utgivelsesdato: 2022-11-16
Versjon A3

NORSK

TILTENKT BRUK

BÜHLMANN fCAL® ELISA er en *in vitro*-diagnostisk test for kvantitativ fastsettelse av kalprotektin i avføringsprøver fra mennesker, for å vurdere inflammasjon i tarmmukosa. Analyseresultatene kan brukes som et hjelpemiddel for å skille mellom organisk, inflammatorisk sykdom i mage-tarm-kanalen (inflammatorisk tarmsykdom, IBD, særlig Crohns sykdom eller ulcerativ kolitt, UC) og funksjonell sykdom (irritabel tarmsyndrom, IBS) (ref. 1-7), hos pasienter med kroniske magesmerter, og som et hjelpemiddel i overvåking av IBD-sykdom (ref. 7-18).

Kun til laboratoriebruk.

ANALYSENS PRINSIPPER

BÜHLMANN fCAL® ELISA muliggjør selektiv måling av kalprotektin i avføringsprøver, med fangst (sandwich)-ELISA. Mikrotiterplaten til BÜHLMANN fCAL® ELISA er belagt med en monoklonalt capture-antistoff (mAb) med høy spesifisitet til kalprotektinets heterodimeriske og polymeriske komplekser. Avføringsprøver fra pasienter, kontroller for fastsettelse av ELISAs akseptbarhet for kjøring samt kalibratorer lastes på brønner på mikrotiterplaten. Etter 30 minutters inkubering i romtemperatur, samt vasketrinn, registrerer et deteksjonsantistoff (Ab) konjugert til pepperrotperoksidase (HRP) kalprotektinmolekylene bundet til capture-antistoffet på platen. Etter inkubering og ytterligere vasketrinn tilsettes det kromogene HRP-substratet, tetrametylbenzidin (TMB) (blå fargedannelse) etterfulgt av en stoppreaksjon (endring til gul farge). Absorpsjonen måles ved 450 nm. Den endelige kalprotektinkonsentrasjonen i µg/g avføring i pasientens prøve fastsettes ved bruk av kalibreringskurven som genereres ut fra de målte kalibratorverdiene.

MEDFØLGENDE REAGENSER OG KLARGJØRING

Reagenser	Antall		Kode	Rekonstituering
	EK-CAL	EK-CAL2		
Ekstraksjonsbuffer	3 flasker x 125 mL	6 flasker x 125 mL	B-CAL-EX	Klar til bruk
Mikrotiterplate forhåndsbelagt med anti-kalprotektin mAb	12 x 8 brønnstrips med ramme	2 x 12 x 8 brønnstrips med ramme	B-CAL-MP	Klar til bruk
Plateforsegler	3 stk	6 stk	-	Klar til bruk
Vaskebuffer-konsentrat (10x) med konserveringsmidler	1 flaske x 100 mL	2 flasker x 100 mL	B-CAL-WB	Fortynn hver med 900 mL avionisert H ₂ O
Inkuberingsbuffer med konserveringsmidler	2 flasker x 125 mL	3 flasker x 125 mL	B-CAL-IB	Klar til bruk
Kalibratører A til E^(1) 2)	5 hetteglass x 1 mL	5 hetteglass x 1 mL	B-CAL-CASET	Klar til bruk

Reagenser	Antall		Kode	Rekonstituering
	EK-CAL	EK-CAL2		
Lav/høy kontroll³⁾ Serumderivert kalprotektin i en buffermatrise med konserveringsmidler	2 hetteglass x 1 mL	2 hetteglass x 1 mL	B-CAL-CONSET	Klar til bruk
Enzymmerking Anti-kalprotektin Ab konjugert til HRP	1 hetteglass x 12 mL	2 hetteglass x 12 mL	B-CAL-EL	Klar til bruk
TMB-substrat TMB i sitratbuffer	1 hetteglass x 12 mL	2 hetteglass x 12 mL	B-TMB12	Klar til bruk
Stoppløsning 0,25 M svovelsyre	1 hetteglass x 12 mL	2 hetteglass x 12 mL	B-ST512	Klar til bruk Korroderende middel

Tabell 1

- Den faktiske kalprotektinkonsentrasjonen til kalibratorene A til E er henholdsvis 4, 12, 40, 120 og 240 ng/mL. For ELISA-prosedyren for det lavere området må kalibratorverdiene settes til: 10, 30, 100, 300 og 600 µg/g kalprotektin. Tilordningen tilsvarer den endelige 1:2500 prøvefortynningen i ELISA-prosedyren for det lavere området.
- Hvis du velger ELISA-prosedyren for det utvidete området, må de nominelle kalibratorverdiene settes til: 30, 90, 300, 900 og 1800 µg/g kalprotektin. Tilordningen tilsvarer den endelige 1:7500 prøvefortynningen i ELISA-prosedyren for det utvidete området.
- Kontrollene inneholder partispesifikke mengder med nativt humant kalprotektin. Se det ekstra kvalitetsdatabladet for de faktiske konsentrasjonene.

OPPBEVARING AV OG STABILITET FOR REAGENSER OG VIRKNINGSLØSNINGER

Forsglede/uåpnede reagenser	
Oppbevares ved 2–8 °C. Ikke bruk reagensene etter utløpsdatoen som er trykt på etikettene.	
Åpnede/rekonstituerte reagenser	
Ekstraksjonsbuffer	Oppbevares i høyst 6 måneder ved 2–8 °C.
Mikrotiterplate	Sett ubrukte strips umiddelbart tilbake i folieposen som inneholder pakkene med tørkemiddel, og forsegl langs hele zip-forseglingsskanten. Oppbevares i høyst 6 måneder ved 2–8 °C.
Fortynnet vaskebuffer	Oppbevares i høyst 6 måneder ved 2–8 °C.
Inkuberingsbuffer	
Kalibratører	
Kontroller	
Enzymmerking	
TMB-substrat	
Stoppløsning	

Tabell 2

MEDFØLGENDE OG EKSTRA REAGENSER OG MATERIALER

Enheter for ekstraksjon av avføring

Enheter for ekstraksjon av avføring beskrevet i tabell 3, følger ikke med i settet. De valgte ekstraksjonsenheter må bestilles separat.

Sett med ekstraksjonsenheter	Antall	Kode
CALEX® Cap	Pakker med 50, 200 eller 500 rør er tilgjengelig, hvert rør fylt med 5 mL ekstraksjonsbuffer Klar til bruk	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200 B-CALEX-C500
Smart-Prep	50 rør, spatler og bunnhetter	B-CAL-RD

Tabell 3

NØDVENDIG, MEN IKKE MEDFØLGENDE MATERIELL

Ekstraksjonsprosedyre

- 100 µL og 1000 µL presisjonspipetter med engangstupper
- Engangsrør i polystyren eller polypropylen for overføring av ekstrakter (tilleggsutstyr)
- Arbeidsstasjon med laminærstrømning
- Vorteksmikser for flere rør / vorteksmikser
- Mikrosentrifuge (≥3000 x g)
- Sentrifuge (≥500 x g)
- Ekstraksjonsenheter (se tabell 3 over) eller for den manuelle ekstraksjonsprosedyren:
 - 10 µL inokulasjonsløkker til engangsbruk
 - 15 mL rør i polypropylen med skruhetter kreves
 - Presisjonsvekt (10–200 mg)

ELISA-prosedyre

- 10 µL, 100 µL og 1000 µL presisjonspipetter med engangstupper
- Engangsrør i polystyren eller polypropylen for klargjøring av prøvefortynninger
- 1000 mL sylinder for fortynning av vaskebufferen
- Mikrotiterplatevasker (se tekniske spesifikasjoner) eller klemflaske for vaskebuffer
- Mikrotiterplaterister (se tekniske spesifikasjoner)
- Trekkpapir
- Mikrotiterplateleser for måling av absorbans ved 450 nm

ADVARSLER OG FORSIKTIGHETSREGLER

Sikkerhetsforholdsregler

- Kalibratorene og kontrollene i denne testen inneholder komponenter av human opprinnelse. Selv om reagensene er testet og funnet å være negative for HBV-overflateantistoff, HCV- og HIV1/2-antistoffer, skal de håndteres som om de kan overføre infeksjoner, og skal håndteres i samsvar med God laboratoriepraksis (GLP), og egnede forholdsregler skal iverksettes.
- Dette settet inneholder komponenter som er klassifisert i samsvar med Forordning (EC) nr. 1272/2008:
 - 2-metyl-4-isotiazolin-3-en hydroklorid (kons. ≥ 0,0015%), hvilket innebærer at reagensene kan gi allergiske hudreaksjoner (H317).

Svovelsyre (kons. ≥2,5–<5%), hvilket innebærer at reagensene kan gi hudirritasjon (H315) og alvorlig øyeirritasjon (H319.)

- Unngå at reagensene kommer i kontakt med hud, øyne eller slimhinner. Hvis kontakt skulle forekomme, vask umiddelbart med rikelig med vann. Hvis ikke kan det oppstå irritasjon/brannår.
- Reagenser og kjemikalier skal behandles som farlig avfall i henhold til de nasjonale retningslinjene eller forskriftene for biologisk farlig avfall.

Tekniske forholdsregler

Settets komponenter

- Rester i mikrotiterplatebrønnene kommer fra produksjonsprosessen. De fjernes i vasketrinnet (analysens prosedyretrinn 3), og påvirker ikke resultatene.
- Komponentene må ikke brukes etter utløpsdatoen som er trykt på etikettene.
- Ikke bland eller bruk komponenter fra sett med forskjellige partinummer.
- Gjør alt som trengs for å sikre at det ikke oppstår krysskontaminering mellom reagenser, prøver eller mellom brønner.
- La reagensene utlignes til romtemperatur. Bland (virvle) reagensene godt før bruk.
- Mikrobrønnene kan ikke gjenbrukes.

Manuell ekstraksjonsprosedyre

- For å få kvantitative resultater er det viktig å homogenisere den tilsatte avføringen fullstendig i ekstraksjonsbufferen. Kontamineringer i toppen av ekstraksjonsrøret må unngås. Det kan være en liten mengde uoppløselige partikler igjen etter blanding.

ELISA-prosedyre

- I ELISA-prosedyren er vasketrinne avgjørende for å garantere reproducerbare resultater. La vaskebufferen inkuberes i brønnene i minst 20 sekunder før den fjernes.
- Hvis en automatisk vaskemaskin brukes, anbefales "platemodus" på det sterkeste. Det vil si at hvert enkelt prosesstrinn (dispensering/aspirering) utføres på alle stripsene etter hverandre, før instrumentet fortsetter med den neste vaskesyklusen. Dermed garanteres den korteste inkuberingstiden.
- Det angitte antallet vaskesykluser er obligatorisk for å sikre reproducerbare resultater.
- Plateristen må justeres til ca. 450 r/min (7,5 Hz). Høyere rotasjonsfrekvens kan gi dårlig fortynningslinearitet på verdier mellom 300/900 og 600/1800 µg/g. En roterende bevegelse skal brukes i stedet for en vannrett bevegelse.
- Fr å sikre at antistoff-/antigenbevegelsen er fullført, må inkuberingstiden i trinn 5 være minst 30 minutter. Moderat lengre inkuberingstid (opptil 5 minutter) påvirker ikke det endelige resultatet.
- Enzymmerkingen aktiveres av oksygen og er svært følsom for natriumazid, timerosal, hypoklorsyre og aromatiske klorhydrokarboner som ofte finnes i

vannforsyningen i laboratorier. Derfor må bare avionisert vann av høy kvalitet brukes.

- En ny standardkurve må genereres hver gang analysen utføres (hver plate eller delvise plate).
- Hvis den innledende konsentrasjonen av en ukjent prøve er over konsentrasjonen til den høyeste kalibratoren, kalibrator E, kan prøven fortynnes ytterligere med inkuberingsbuffer og analyseres på nytt i henhold til analyseprosedyren. Den resulterende totale fortynningsfaktoren må tas med i beregningen når resultatene regnes ut.

PRØVEINNSAMLING OG -OPPBEVARING

Det kreves mindre enn 1 g nativ avføringsprøve for ekstraksjonsprosedyren. Samle inn avføringsprøver i vanlige rør.

Viktig: Prøven må samles inn uten kjemiske eller biologiske tilsetninger.

Transport av prøve

Avføringsprøver skal mottas for behandling i laboratoriet inne 3 dager etter innsamling. Prøvene kan transporteres ved romtemperatur eller avkjølt.

Oppbevaring av prøve

Avføringsprøver skal avkjøles ved 2–8 °C og ekstraheres innen 3 dager etter at de er mottatt ved laboratoriet. Prøver skal ikke oppbevares ved høye temperaturer.

EKSTRAKSJON AV AVFØRINGSPRØVER OG EKSTRAKTETS STABILITET

1. CALEX® Cap

1.1 Ekstraksjonsprosedyre

Følg bruksanvisningen som følger med CALEX® Cap (kode B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200 / B-CALEX-C500).

CALEX® Cap: Flytende avføringsprøver kan pipetteres direkte i CALEX® Cap. Skru av den blå hetten og pipetter 10 µL avføringsprøve i enheten. Sett hetten tilbake på CALEX® Cap og fortsett med virvlingstrinnet i samsvar med ekstraksjonsprosedyren som er beskrevet og illustrert i bruksanvisningen som følger med CALEX® Cap.

Viktig: Etter ekstraksjon skal CALEX® Cap sentrifugeres i 5 minutter ved 500–3000 x g. Fortsett deretter med analyseprosedyren.

1.2 Oppbevaring av ekstrakt

Fekale kalprotektinekstrakter som er oppnådd med CALEX® Cap, er stabile ved romtemperatur (23 °C) i 7 dager, og ved 2–8 °C i opptil 15 dager. Hvis ekstraktene skal oppbevares lenger, skal de fryses ved -20 °C. Frosne ekstrakter er stabile i opptil 23 måneder.

CALEX® Cap ekstrakt kan fryses direkte og oppbevares i CALEX® Cap røret. Ekstrakter tåler fire fryse-tine-sykluser. Før måling skal frosne ekstrakter utlignes til romtemperatur, virvles grundig i 10 sekunder og sentrifugeres i 5 minutter ved 500–3000 x g.

2. Andre ekstraksjonsenheter

2.1 Ekstraksjonsprosedyrer

Følg bruksanvisningen som følger med den aktuelle ekstraksjonsenheten:

- Fekal ekstraksjonsenhet (kode 10745804322) eller BÜHLMANN Smart-Prep (kode: B-CAL-RD).

Viktig: Etter ekstraksjon med BÜHLMANN Smart Prep skal rørene sentrifugeres i 5 minutter ved 3000 x g. Alternativt kan homogenatet overføres til et 2 mL Eppendorf-rør og sentrifugeres i en mikrosentrifuge i 5 minutter ved 3000 x g. Hell supernatanten i et nytt, merket rør og fortsett med analyseprosedyren.

2.2 Oppbevaring av ekstrakt

Fekale kalprotektinekstrakter som er oppnådd med Smart-Prep, er stabile ved 2–8 °C i ≤7 dager eller ved -20 °C i 36 måneder.

3. Manuell ekstraksjon

3.1 Ekstraksjonsprosedyre

1. Merk og vei det tomme polypropylenrøret, inkludert inokulasjonsløggen. Noter vekten (tara).
2. Ta ut 50 til 100 mg av avføringsprøven ved hjelp av inokulasjonsløggen, og sett den inn i det forhåndsveide røret, og vei det på nytt (bruttovekt). Unngå å få med kostfibre som finnes i prøven, i prøveinnsamlingsprosessen.
3. Regn ut nettomengden prøve ved å trekke taravekten fra bruttovekten. Bryt av inokulasjonsløggen og la den nedre delen av løggen være i røret.
4. Tilsett ekstraksjonsbuffer i henhold til formelen $x \text{ mg avføring} \times 49 = y \text{ µL ekstraksjonsbuffer}$ (f.eks. 50 mg avføring + 2450 µL buffer) i røret, og lukk røret.
5. Ekstraher prøver ved å
 - virvle kraftig ekstraksjonsrøret med bufferen og avføringsprøven på en vorteksmikser (for flere rør) (ved høyeste hastighet) i 30 sekunder.
 - Deretter inkuberer du ekstraksjonsrøret i 25 +/- 5 minutter på en platerister ved ca. 400 r/min. Inokulasjonsløggen inne i røret bidrar til at blandingen ristes kraftigere.
 - Virvle ekstraksjonsrøret kraftig på nytt i 30 sekunder.
6. Overfør 1,5 mL av homogenatet i et 2 mL Eppendorf-rør og sentrifuger i en mikrosentrifuge i 5 minutter ved 3000 x g.
7. Hell supernatanten i et nytt, merket rør og fortsett med analyseprosedyren, eller sett ekstraktene til oppbevaring (se oppbevaring av ekstrakt).

3.2 Oppbevaring av ekstrakt

Fekale kalprotektinekstrakter oppnådd ved manuell ekstraksjon kan oppbevares ved 2–8 °C i ≤7 dager eller ved -20 °C i 36 måneder.

VIRKNINGSOMRÅDE

Analysen kan utføres i henhold til følgende prosedyrer: ELISA-prosedyre for nedre eller utvidet område. Den riktige prosedyren skal velges avhengig av den forventede kalprotektinkonsentrasjonen:

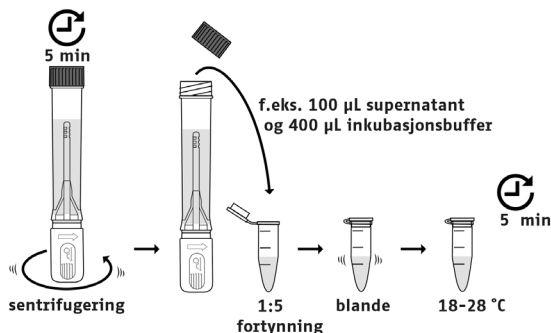
- For prøver opptil 600 µg/g kalprotektin velges prosedyren for det nedre området (virkningsområde 10–600 µg/g).
- Hvis prøvene ofte er over 600 µg/g, velges prosedyren for det utvidede området (virkningsområde 30–1800 µg/g).

ANALYSEPROSEDYRE

Viktig: La alle reagensene utlignes i minst 30 minutter til 18–28 °C før bruk. Fortynn kun avføringsekstrakter. Kalibratorene og kontrollene er klare til bruk.

1. Prøvefortynning alternativ 1: Virkningsområde 10–600 µg/g

1.1. **CALEX®-Cap:** Fortynn avføringsekstraktene 1:5 med inkuberingsbuffer (f.eks. 100 µL ekstrakt og 400 µL inkuberingsbuffer) og bland godt. La prøvene utlignes i minst 5 minutter ved 18–28 °C før du fortsetter med trinn 4c.

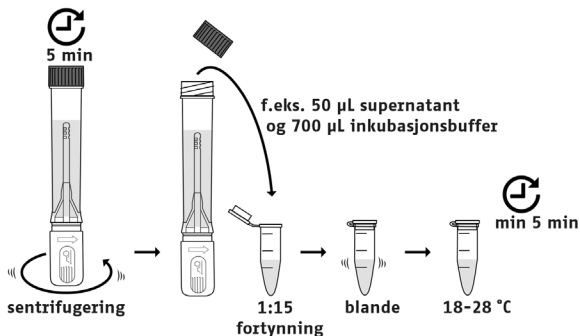


1.2 **Manuell ekstraksjon eller Smart-Prep:** Fortynn avføringsekstraktene 1:50 med inkuberingsbuffer (f.eks. 20 µL ekstrakt og 980 µL inkuberingsbuffer) og bland godt. La prøvene utlignes i minst 5 minutter ved 18–28 °C før du fortsetter med trinn 4c.

1. Prøvefortynning alternativ 2: Virkningsområde 30–1800 µg/g

Virkningsområdet kan utvides med en faktor på 3 hvis du fortynner prøvene 1:7500 i stedet for 1:2500. Denne prosedyren anbefales hvis det forventes høye kalprotektinkonsentrasjoner.

1.1' **CALEX® Cap:** Fortynn avføringsekstraktene 1:15 med inkuberingsbuffer (f.eks. 50 µL ekstrakt og 700 µL inkuberingsbuffer) og bland godt. La prøvene utlignes i minst 5 minutter ved 18–28 °C før du fortsetter med trinn 4c.

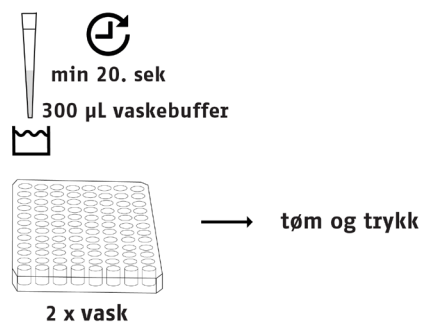


1.2' **Manuell ekstraksjon eller Smart-Prep:** Fortynn avføringsekstraktene 1:150 med inkuberingsbuffer (f.eks. 20 µL ekstrakt og 2980 µL inkuberingsbuffer) og bland godt. La prøvene utlignes i minst 5 minutter ved 18–28 °C før du fortsetter med trinn 4c.

2. Klargjør platerammen med tilstrekkelige strips til det nødvendige antallet kalibratorene, kontrollene og fortynnede prøver. Fjern overflødig strips fra rammen og forsegl dem på nytt i folieposen sammen med posene med tørkemiddel så snart som mulig. Oppbevares i kjøleskap.

3. Vask de belagte brønnene to ganger med minst 300 µL vaskebuffer per brønn. Tøm brønnene og dunk platen bestemt mot trekkpapiret.

Viktig: La vaskebufferen være i brønnene i minst 20 sekunder i hvert vasketrinn.



4a. Pipetter 100 µL inkuberingsbuffer (blank) og

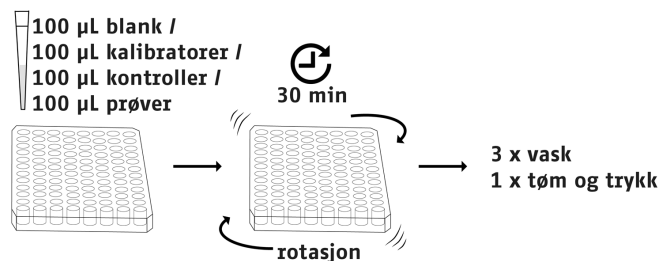
Pipetter 100 µL kalibrator A-E i de respektive brønnene.

4b. Pipetter 100 µL høy og lav kontroll i de respektive brønnene.

4c. Pipetter 100 µL fortynnet prøve i de påfølgende brønnene.

5. Dekk til platen med en plateforsegler og inkuber i 30 + maks. 5 min på en platerister satt til ~450 r/min ved 18–28 °C (se tekniske forholdsregler – ELISA-prosedyre).

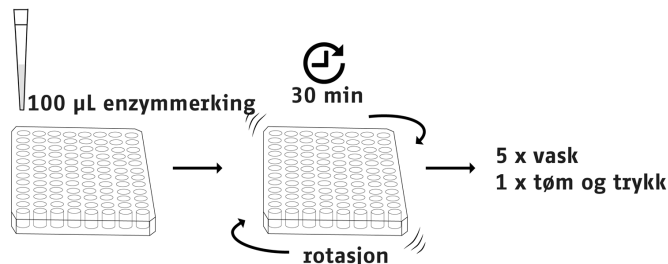
6. Fjern og kasser plateforsegleren. Tøm brønnene og vask dem tre ganger med minst 300 µL vaskebuffer per brønn (se tekniske forholdsregler – ELISA-prosedyre). Tøm brønnene og dunk platen bestemt mot trekkpapiret.



7. Pipetter 100 µL enzymmerking i alle brønnene.

8. Dekk til platen med en plateforsegler og inkuber i 30±5 min på en platerister satt til ~450 r/min ved 18–28 °C.

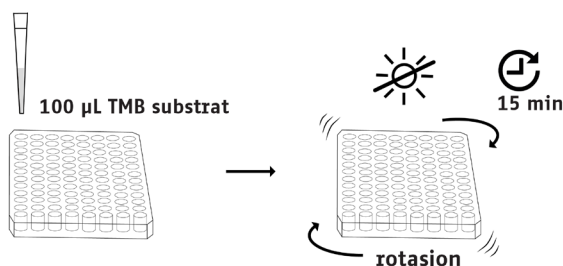
9. Fjern og kasser plateforsegleren. Tøm brønnene og vask dem fem ganger med minst 300 µL vaskebuffer per brønn. Tøm brønnene og dunk platen bestemt mot trekkpapiret.



Viktig: La TMB-substratopløsningen utlignes til 18-28 °C.

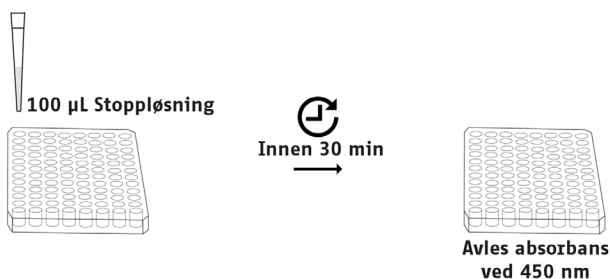
10. Pipetter 100 µL TMB-substratopløsning i alle brønnene.

11. Dekk til platen med en plateforsegler, beskytt platen mot direkte lys og inkuber i 15±2 min på en platerister satt til ~450 r/min ved 18–28 °C.



12. Pipetter 100 µL stoppløsning i alle brønnene. Fjern luftbobler med en pipettespiss. Fortsett med trinn 13 innen 30 min.

13. Les av absorbansen ved 450 nm i en mikrotiterplateleser.



KVALITETSKONTROLL

Man må ha en inngående forståelse av bruksanvisningen for å kunne bruke produktet på riktig måte. Man får pålitelige resultater kun med presise laborieteknikker og ved å følge denne bruksanvisningen nøyaktig.

BÜHLMANN fCAL® ELISA-settet leveres med to kontroller: lav og høy kontroll. De tilsvarende referanseverdiene for kontrollene er oppgitt i kvalitetsdatabladet som følger med hvert sett. Verdiene og områdene som er oppgitt i kvalitetsdatabladet, visert alltid til den aktuelle settpartiet, og skal brukes til direkte sammenligning av resultatene. Dersom resultatene for høy og/eller lav kontroll skulle være utenfor området som er oppgitt i kvalitetsdatabladet, anbefales det å anse hele kjøringen som ugyldig.

Det anbefales å bruke interne kontrollprøver, i tillegg til settkontroller, i samsvar med lokale og nasjonale forskrifter. Bruk av interne kontroller tilrådes for å sikre prøvenes gyldighet daglig. Ettersom det ikke er noen kommersielt tilgjengelig kontroll for fekalt kalprotektin, anbefaler vi å bruke en samling av avføringsekstrakter med normale og patologiske nivåer for intern kvalitetskontroll.

Reproduserbarheten til standardkurveparametrene og kontrollverdiene skal være innenfor fastsatte for laboratorieakseptabilitet. Hvis analyseytelsen ikke er innenfor de fastsatte grensene, og repetisjon har utelukket feil i teknikk, skal følgende kontrolleres: i) pipettering, enheter for temperaturkontroll og tidtaking, ii) innstillingene til ELISA-avleseren, iii) reagensenes utløpsdato, iv) oppbevarings- og inkuberingsforhold, v) TMB-substratopløsningen skal være fargeløs, vi) vannets renhet, vii) aspirerings- og vaskemetoder.

STANDARDISERING OG METROLOGISK SPORBARHET

Det er ikke noe internasjonalt eller nasjonalt anerkjent referansemateriale eller referanse-måleprosedyrer for

kalprotektinanalytten i avføringsprøver. Kalibratorverdiene for BÜHLMANN fCAL® ELISA tilordnes i flere målingskjøringer basert på humant serum og BÜHLMANN fCAL® ELISA-måleprosedyren. Kalprotektinkonsentrasjonen i det interne referansematerialet ble fastsatt ved bruk av rensed MRP8/14 fra humane granulocytter som primært referansemateriale.

95% konfidensintervallet for den samlede usikkerheten til produktkalibratorene ble fastsatt som under 13,3%, den samlede usikkerheten til produktkontrollene til under 16,4%.

UTREGNING AV TESTRESULTATER

Standardkurve

Det anbefales å bruke et program som kan håndtere de følgende utregningene; subtrahere den blanke OD-verdien fra hver kalibratorbrønn for å regne ut kalibratorverdien. Fastsett en standardkurve ved bruk av en logistikktilpasning med 4 parametere (4 PL).

Kontroller og prøver

Det anbefales å bruke et program som kan håndtere de følgende utregningene; subtrahere den blanke OD-verdien fra hver kontroll/kalibratorbrønn. Regne ut kalprotektinkonsentrasjonen i kontrollen/prøven i hver brønn, i µg/g, ved bruk av den fastsatte standardkurven.

Virkningsområde 10–600 µg/g

Hvis du velger ELISA-prosedyren for det lavere området, må kalibratorkonsentrasjonene settes til: 10, 30, 100, 300 og 600 µg/g kalprotektin. Ytterligere forfynningsfaktorer (hvis det brukes en annen endelig forfynning enn 1:2500) må multipliseres med resultatene for å finne de endelige resultatene.

Se tabell 12 og figur 1 for typiske data (resultater og standardkurve). Disse resultatene og standardkurven er kun til demonstrasjonsformål. Det må genereres en standardkurve for hvert sett med prøver som skal analyseres.

Virkningsområde 30–1800 µg/g

Hvis du velger ELISA-prosedyren for det utvidete området, må de følgende nominelle kalibratorverdiene settes til: 30, 90, 300, 900 og 1800 µg/g kalprotektin. Ytterligere forfynningsfaktorer (hvis det brukes en annen endelig forfynning enn 1:7500) må multipliseres med resultatene for å finne de endelige resultatene.

Se tabell 15 og figur 3 for typiske data (resultater og standardkurve). Disse resultatene og standardkurven er kun til demonstrasjonsformål. Det må genereres en standardkurve for hvert sett med prøver som skal analyseres.

BEGRENSNINGER

- Reagenser som leveres med BÜHLMANN fCAL® ELISA-settet, er kun ment for fastsettelse av kalprotektinnivåer i humane avføringsprøver.
- Testresultatene skal tolkes i sammenheng med tilgjengelig informasjon fra klinisk vurdering av pasienten og andre diagnostiske prosedyrer.
- For overvåking av IBD-sykdom har det vært antydning av flere målinger av fekalt kalprotektin, utført med opptil 4 ukers mellomrom, har den største diagnostiske

nøyaktigheten i å forutsi klinisk tilbakefall hos pasienter (ref. 19–20).

- Det kan hende at resultatene ikke er klinisk brukbare hos barn under 4 år, som har lett forhøyede kalprotektinnivåer i feces (ref. 21–24).
- Noen pasienter som tar ikke-steroid antiinflammatoriske legemidler (NSAID), vil ha forhøyede kalprotektinnivåer i feces.

TOLKE RESULTATENE

I. Skille mellom organisk sykdom og funksjonell gastrointestinal sykdom

Resultatkategoriene er basert på data fra kliniske studier utført av BÜHLMANN, og er BÜHLMANNs anbefalinger. Alle testresultater skal tolkes i sammenheng med tilgjengelig informasjon fra pasientens kliniske symptomer, medisinske historikk og andre kliniske funn og laboratoriefunn.

Kliniske terskler

Resultater fra 58 kliniske prøver fra pasienter diagnostisert med IBS og 131 kliniske prøver fra pasienter diagnostisert med IBD, fra en internasjonal, klinisk studie, ble analysert for å få frem verdiene beskrevet i tabell 4.

Kalprotektinkonsentrasjon	Tolkning	Oppfølging
< 80 µg/g	Normal	Ingen
80–160 µg/g	Gråsoner/Borderline	Oppfølging innen 4–6 uker
> 160 µg/g	Forhøyet	Gjenta etter behov

Tabell 4

Kalprotektinverdier under 80 µg/g

Fekale kalprotektinverdier <80 µg/g er ikke indikative for inflammasjon i mage-tarm-kanalen. Pasienter med lave kalprotektinverdier trenger trolig ikke invasive prosedyrer for å fastsette årsaken til inflammasjonen.

Kalprotektinverdier mellom og lik 80 og 160 µg/g

Midtre fekale kalprotektinnivåer mellom og lik 80 og 160 µg/g, også kalt gråsonenivåer, er ikke direkte indikative for en aktiv inflammasjon som krever umiddelbar oppfølging med invasiv testing. Imidlertid kan ikke en inflammasjon utelukkes. Det anbefales å evaluere fekale kalprotektinnivåer på nytt etter 4 til 6 uker for å fastslå inflammasjonsstatusen.

Kalprotektinverdier over 160 µg/g

Fekale kalprotektinnivåer >160 µg/g er indikative for et nøytrofilit infiltrat i mage-tarm-kanalen. Dette kan derfor være et tegn på en aktiv inflammatorisk sykdom. Det foreslås derfor at egnede ytterligere undersøkelsesprosedyrer utføres av spesialister for å få en total klinisk diagnose.

Klinisk evaluering

BÜHLMANN fCAL® ELISAs evne til å skille mellom pasienter med IBD og andre ikke-inflammatoriske GI-sykdommer, inkludert IBS, ble testet i en klinisk studie med totalt 337 voksne og pediatriske pasienter. Ett hundre og trettifem (135) pasienter hadde en endelig IBD-diagnose (Crohns sykdom, ulcerativ kolitt eller ubestemt kolitt), 130 pasienter hadde IBD, og 72 pasienter hadde magesmerter

og/eller diaré, eller andre GI-relaterte ikke-inflammatoriske tilstander (se tabell 5). Endelig diagnose var støttet av endoskopiske og andre funn.

En klinisk sensitivitet på 93,3% ved 80 µg/g og en klinisk spesifisitet på 83,7% ved 160 µg/g kan nås ved differensiering mellom IBD og GI-relaterte ikke-inflammatoriske tilstander, inkludert IBS. ROC-kurveanalyse ga en AUC på 0,923 (se tabell 6).

En klinisk sensitivitet på 93,3% ved 80 µg/g og en klinisk spesifisitet på 85,4% ved 160 µg/g kan nås ved differensiering mellom IBD og IBS. ROC-kurveanalyse ga en AUC på 0,933 (se tabell 8).

Den optimale cut-off-kombinasjonen for disse pasientgruppene kan defineres med ROC-analyse ved 80 µg/g og 160 µg/g kalprotektin, som er noe strengere enn en kombinasjon av **en mer følsom nedre cut-off på 50 µg/g** med lavere ytelse i spesifisitet, og **en øvre cut-off på 200 µg/g** med noe lavere sensitivitet (tabell 7 og 9).

II. IBD-overvåking

Kliniske terskler og evaluering

Fastsettelse av fekal kalprotektin er en pålitelig og enkel måte å assistere overvåkingen av IBD-pasienter på (ref.7–18).

Korrelasjon mellom kalprotektinnivåer og inflammasjonsstatus for pasientens intestinale mukosa, i henhold til endoskopiske evalueringer, ble fastsatt i tre uavhengige studier som brukte BÜHLMANNs kalprotektintester (tabell 10). Kalprotektins diagnostiske verdi for å forutse klinisk remisjon og tilbakefall, i henhold til pasientens symptomer, indikasjoner på klinisk aktivitet, uplanlagt behov for opptrapping av behandling, sykehusinnleggelse eller akuttbehandling, ble fastsatt i tre studier som brukte BÜHLMANNs kalprotektintester (tabell 11).

De viste resultatkategoriene er anbefalinger, og fastsettelse av disse er basert på kondensert kunnskap om publiserte cut-off og studier av klinisk ytelse. Det anbefales at helsepersonell fastsetter individuelle terskler for pasientene, ved å fastslå pasientens kalprotektinnivå ved baseline under sykdomsremisjon.

Kalprotektinverdier under 100 µg/g

Fekale kalprotektinnivåer under 100 µg/g kan pålitelig indikere pasienter, med lav risiko for klinisk tilbakefall, i endoskopisk remisjon, der invasive endoskopiske prosedyrer kan unngås (ref. 7–18).

Kalprotektinnivåer mellom 100 og 300 µg/g

Fekale kalprotektinnivåer mellom 100 og 300 µg/g kan indikere at det er nødvendig med tettere kontroll i den påfølgende perioden, for å vurdere sykdommens utviklingstendenser.

Kalprotektinverdier over 300 µg/g

Fekale kalprotektinnivåer over 300 µg/g skal gjentas og, hvis forhøyede nivåer bekreftes, utløse ytterligere undersøkelsesprosedyrer (ref. 7–18).

YTELSESEGENSKAPER

Ytelsesegenskapene til BÜHLMANN fCAL® ELISA ble fastsatt ved bruk av den manuelle ekstraksjonsmetoden, med mindre noe annet er oppgitt.

Virkningsområde: 10–600 µg/g

Repetierbarhet: 1,9–8,0% CV

Presisjon innenfor laboratorium 5,5–14,0% CV

Repetierbarhet og presisjon innenfor laboratorium ble fastsatt basert på CLSI-retningslinjen EP05-A2 ved bruk av en studiedesign med 22 dager x 2 replikater. Ti ekstraherte avføringsprøver med kalprotektinkonsentrasjoner fra 13,2 til 501,4 µg/g ble testet (tabell 13).

Deteksjonsgrense (LoD) 4,2 µg/g

LoD ble fastsatt i henhold til CLIS-retningslinjen EP17-A og med andeler falske positive (α) under 5% og falske negative (β) under 5% basert på 240 fastsettelse, med 80 blanke (ekstraksjonsbuffer) og 160 lave replikater, og en **LoB på 0,29 µg/g**.

Kvantifiseringsgrense (LoQ) 9,8 µg/g

LoQ ble fastsatt ved bruk av data fra studien av presisjon innenfor laboratorium, inkludert en ekstra avføringsprøve med en konsentrasjon på 7,4 µg/g. LoQ ble fastsatt som den kalprotektinkonsentrasjonen der den ikke-lineære tilpasningen av totale presisjonsdata krysset presisjonsmålet på 20% CV.

Linearitet 10–600 µg/g

Det lineære området til BÜHLMANN fCAL® ELISA ble fastsatt i samsvar med CLSI-retningslinjen EP06-A. Et maksimalt avvik fra linearitet på $\pm 20\%$ var tillatt. For verdier under 75 µg/g var en absolutt forskjell på under ± 15 µg/g tillatt (tabell 14).

Nøyaktighet/bedring

Total skjevhet: -1,1%;

Nedre samsvarsgrense: -17,5%,

Øvre samsvarsgrense: 15,4%

Fire negative ekstraherte avføringsprøver ble forsterket med økende mengder kalprotektin fra serumprøver. Resultatene er presentert i figur 2.

Høydose hook-effekt

Prøver med teoretiske konsentrasjoner på opptil ~60 000 µg/g kan analyseres uten å begrense analysens virkningsområde.

Virkningsområde: 30–1800 µg/g

Repetierbarhet: 1,7–5,8% CV

Presisjon innenfor laboratorium 3,1–9,4% CV

Repetierbarhet og presisjon innenfor laboratorium ble fastsatt basert på CLSI-retningslinjen EP05-A3 ved bruk av en studiedesign med 10 dager x 2 kjøring x 4 replikater. Syv ekstraherte avføringsprøver med kalprotektinkonsentrasjoner fra 38,5 til 918,0 µg/g ble testet (tabell 16).

Presisjon mellom partier: 4,2–9,7% CV

Presisjon mellom partier ble fastslått i samsvar med CLSI-retningslinjen EP05-A3 ved bruk av en studiedesign med 3 partier x 5 dager x 5 replikater, og en komponentmodell med tilfeldig effektvarians. Seks ekstraherte avføringsprøver med kalprotektinkonsentrasjoner fra 46,4 til 1476,1 µg/g ble testet (tabell 17).

Reproduserbarhet (flersenterstudie av presisjonsevaluering) 6,4–19,0% CV

Reproduserbarhet ble fastslått i samsvar med CLSI-retningslinjen EP05-A3 ved bruk av en studiedesign med 3 laboratoriesteder x 2 operatører x 5 dager x 2 kjøring daglig x 4 replikater. Tre reagenspartier ble brukt i studien. Fem ekstraherte avføringsprøver med kalprotektinkonsentrasjoner fra 42,1 til 1053,3 µg/g ble testet (tabell 18).

Deteksjonsgrense (LoD) 12,6 µg/g

LoD ble fastsatt i henhold til CLIS-retningslinjen EP17-A2 og med andeler falske positive (α) under 5% og falske negative (β) under 5% basert på 120 fastsettelse, med 60 blanke (ekstraksjonsbuffer) og 60 lave replikater, og en **LoB på 8,3 µg/g**.

Kvantifiseringsgrense (LoQ) 21,3 µg/g

LoQ ble fastslått i samsvar med CLSI-retningslinjen EP17-A2 basert på 60 fastsettelse og et presisjonsmål på 20% CV.

Linearitet 30 - 1800 µg/g

Det lineære området til BÜHLMANN fCAL® ELISA ble fastsatt i samsvar med CLSI-retningslinjen EP06-A. Et maksimalt avvik fra linearitet på $\pm 20\%$ var tillatt. For verdier under 75 µg/g var en absolutt forskjell på under ± 15 µg/g tillatt (tabell 19).

Nøyaktighet/recovery: 96,4 - 102,2%

Syv avføringsprøveekstrakter med kalprotektinnivåer mellom 46,5 og 990,2 µg/g ble forsterket med 180 µg/g kalprotektin i kalibratormaterialet. Forsterkning ble utført med 10% av prøveekstraktvolumet. "Baseline"-prøver ble forsterket med tilsvarende mengde inkuberingsbuffer. "Baseline" og "baseline + forsterkning"-prøver ble målt i tre replikater (tabell 20).

Preanalys

Ytelsesegenskapene til BÜHLMANN fCAL® ELISA når det gjelder preanalytiske prosedyrer, ble fastsatt ved bruk av virkningsområdet 30–1800 µg/g.

Ekstraksjonens reproduserbarhet – manuell ekstraksjon: 9,5–20,5%

Ekstraksjonens reproduserbarhet ble fastsatt basert på CLSI-retningslinjen EP05-A3 ved bruk av en studiedesign med 10 ekstraksjoner x 2 replikater. Ni kliniske avføringsprøver, inkludert fast, halvfast og flytende prøvekonsistens, med kalprotektinkonsentrasjoner i området 51,2–1783,7 µg/g ble testet (tabell 21).

Ekstraksjonens reproduserbarhet – CALEX® Cap: 7,9–16,9%

Ekstraksjonens reproduserbarhet ble fastsatt basert på CLSI-retningslinjen EP05-A3 ved bruk av en studiedesign med 3 CALEX® Cap x 4 ekstraksjoner x 4 replikater. Fem kliniske avføringsprøver, inkludert fast, halvfast og flytende prøvekonsistens, med kalprotektinkonsentrasjoner i området 42,5–2949,9 µg/g ble testet (tabell 22).

Metodesammenligning CALEX® Cap vs. manuell ekstraksjon

Skjevhet ved 80 µg/g: 5,9% (95% KI: 1,4–12,2%)

Skjevhet ved 160 µg/g: 12,0% (95% KI: 7,8–17,0%)

Gj.snittlig skjevhet: 10,1% (95% KI: 5,7–14,5%)

Metodesammenligningsstudien ble utført i henhold til CLIS-retningslinjen EP09-A3. To hundre og førtien (241) kliniske prøver ble ekstrahert ved bruk av ett parti av CALEX® Cap. Referanseverdier, med et endelig kalprotektinkonsentrasjonsintervall på 30,5–1496,6 µg/g ble fastsatt ved bruk av den manuelle ekstraksjonsmetoden. Ekstrakter ble målt i enkeltfastsettelse i begge metodene. Skjevhet ble fastsatt ved bruk av Passing-Bablok lineær regresjon og Bland-Altman-analyse (tabell 23 og 24).

FORSTYRENDE STOFFER

BÜHLMANN fCAL® ELISAs følsomhet for orale farmasøytika, kosttilskudd, hemoglobin samt enteropatologiske mikroorganismer ble vurdert i henhold til CLSI-retningslinjen EP07-A2, ved bruk av det utvidete virkningsområdet. Skjevhet i resultater som var høyere enn 10%, ble ansett som forstyrrelse. Ingen forstyrrelse ble registrert med stoffer, listet opp i tabell 25, opptil de angitte konsentrasjonene. Ingen forstyrrelse ble registrert med enteropatologiske mikroorganismer, listet opp i tabell 26, opptil de angitte mengdene med kolonidannende enheter (CFU) per mL avføringsprøveekstrakt.

TABELLER OG FIGURER

Kliniske studier

Kliniske studier – skille mellom organisk sykdom og funksjonell gastrointestinal sykdom

Endelig diagnose	Fordeling av pasienters resultater i tall (prosent) med BÜHLMANN fCAL® ELISA diagnostiske områder.			
	< 80 µg/g	80–160 µg/g	> 160 µg/g	Total
IBD	9 (6,7%)	12 (8,9%)	114 (84,4%)	135 (100%)
IBS	94 (72,3%)	17 (13,1%)	19 (14,6%)	130 (100%)
Annen GI	48 (66,7%)	10 (13,9%)	14 (19,4%)	72 (100%)

Tabell 5

IBD vs. ikke-IBD	Klinisk avgjørelsespunkt	
	80 µg/g	160 µg/g
Følsomhet (95% KI)	93,3% (87,7%, 96,9%)	84,4% (77,2%, 90,1%)
Spesifisitet (95% KI)	70,3% (63,5%, 76,5%)	83,7% (77,8%, 88,5%)
PPV (95% KI)	67,7% (60,5%, 74,4%)	77,6% (69,9%, 84,0%)
NPV (95% KI)	94,0% (89,0%, 97,2%)	88,9% (83,6%, 93,0%)
ROC AUC (95% KI)	0,923 (0,893, 0,953)	

Tabell 6

IBD vs. ikke-IBD	Klinisk avgjørelsespunkt	
	50 µg/g	200 µg/g
Følsomhet (95% KI)	96,3% (91,6%, 98,8%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
Spesifisitet (95% KI)	59,9% (52,8%, 66,7%)	87,1% (81,7%, 91,4%)
PPV (95% KI)	61,6% (54,7%, 68,2%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
NPV (95% KI)	96,0% (91,0%, 98,7%)	87,1% (81,7%, 91,4%)

Tabell 7

IBD vs. IBD	Klinisk avgjørelsespunkt	
	80 µg/g	160 µg/g
Følsomhet (95% KI)	93,3% (87,7%, 96,9%)	84,4% (77,2%, 90,1%)
Spesifisitet (95% KI)	72,3% (63,8%, 79,8%)	85,4% (78,1%, 91,0%)
PPV (95% KI)	77,8% (70,6%, 83,9%)	85,7% (78,6%, 91,2%)
NPV (95% KI)	91,3% (84,1%, 95,9%)	84,1% (76,7%, 89,9%)
ROC AUC (95% KI)	0,933 (0,902, 0,963)	

Tabell 8

IBD vs. IBD	Klinisk avgjørelsespunkt	
	50 µg/g	200 µg/g
Følsomhet (95% KI)	96,3% (91,6%, 98,8%)	80,7% (73,1%, 87,0%)
Spesifisitet (95% KI)	59,2% (50,3%, 67,8%)	90,0% (83,5%, 94,6%)
PPV (95% KI)	71,0% (63,9%, 77,5%)	89,3% (82,5%, 94,2%)
NPV (95% KI)	93,9% (86,3%, 98,0%)	81,8% (74,5%, 87,8%)

Tabell 9

ikke-IBD – IBS + annen GI

KI – konfidensintervall

PPV – positiv prediktiv verdi

NPV – negativ prediktiv verdi

ROC AUC – område under receiver operating characteristic-kurven

Kliniske studier – IBD-overvåking

Kalprotektin ¹ vs IBD-aktivitet fastslått ved endoskopiske funn	Studie 1 Spania (ref. 9)	Studie 2 Spania (ref. 10)	Studie 3 Australia, New Zealand (ref.11)
Pasientantall og demografi	89 (CD ²) Alder: 32–58 44 % menn	123 (UC ³) Alder: 18–85 66,4 % menn	99 (CD ² etter reseksjon) Alder: 29–47 46,5 % menn
Cut-off	272 µg/g	280 µg/g	100 µg/g
NPV	98 %	86 %	91 %
PPV	76 %	80,3 %	53 %

Tabell 10

¹ Studie 1 og 2 – Quantum Blue® fCAL og Quantum Blue® fCAL high range
Studie 3 – BÜHLMANN fCAL® ELISA

² CD = Pasienter med Crohns sykdom

³ UC = Pasienter med ulcerativ kolitt

Kliniske studier – IBD-overvåking

Kalprotektin ¹ vs fremtidig klinisk remisjon eller tilbakefall	Studie 4 Storbritannia (ref. 12)	Studie 5 Spania (ref. 13)	Studie 6 Spania (ref. 14)
Pasientantall og demografi	92 (CD ²) 38 % menn	30 (CD ²) behandling med adalimumab Alder: 24–64 43,3 % menn	33 (CD ²) 20 (UC ³) behandling med infliximab Alder: 18–68 47,2 % menn
Oppfølgingstid etter måling av kalprotektin	12 måneder	4 måneder	12 måneder
Pasienter i klinisk tilbakefall etter oppfølging	11 %	30 %	23 %
Cut-off	240 µg/g	204 µg/g	160 µg/g
NPV	96,8 %	100 %	96,1 %
PPV	27,6 %	75 %	68,7 %

Tabell 11

¹ Studie 4 – BÜHLMANN fCAL® ELISA

Studie 5 og 6 – Quantum Blue® fCAL og Quantum Blue® fCAL high range

² CD = Pasienter med Crohns sykdom

³ UC = Pasienter med ulcerativ kolitt

TABELLER OG FIGURER

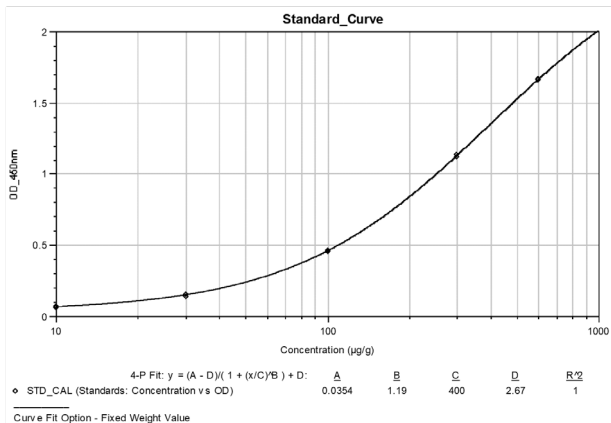
LAVERE VIRKNINGSOMRÅDE PROSEDYRE 10-600 µg/g

Eksempel på resultater

	Kons. [µg/g]	Absorb. [OD]	Kalk. Kons. [µg/g]	CV kons [%]
Blank gj.sn.		0,096		
Kal A	10	0,073		
Kal A	10	0,066		
Kal A gj.sn.	10	0,069		7,2
Kal B	30	0,143		
Kal B	30	0,153		
Kal B gj.sn.	30	0,148		4,8
Kal C	100	0,465		
Kal C	100	0,456		
Kal C gj.sn.	100	0,460		1,4
Kal D	300	1,121		
Kal D	300	1,135		
Kal D gj.sn.	300	1,128		0,9
Kal E	600	1,658		
Kal E	600	1,671		
Kal E gj.sn.	600	1,664		0,6
Ktrl. lav		0,201	41	
Ktrl. lav		0,189	39	
Ktrl. lav gj.sn.		0,195	40	4,4
Ktrl. høy		0,598	134	
Ktrl. høy		0,583	130	
Ktrl. høy gj.sn.		0,590	132	1,8

Tabell 12

Eksempel på en standardkurve



Figur 1

Presisjon innenfor laboratorium

Prøver.	n	Gj.snitt [µg/g]	Repeter-barhet		Mellom dager		Total presisjon	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
nr. 1957	44	13,2	1,0	8,0%	1,5	11,6%	1,8	14,0%
nr. 1933	42	20,5	0,9	4,2%	1,6	7,7%	1,8	8,8%
nr. 1934	44	19,7	1,2	6,0%	1,6	8,4%	2,0	10,3%
nr. 1935	44	37,1	1,2	3,2%	2,1	5,8%	2,4	6,7%
nr. 1936	44	35,4	0,9	2,7%	2,5	7,4%	2,7	7,8%
nr. 1937	44	58,6	1,6	2,9%	3,6	6,4%	3,9	7,0%
nr. 1938	44	83,9	2,6	3,1%	4,3	5,2%	5,0	6,0%
nr. 1939	44	141,4	2,6	1,9%	7,1	5,2%	7,5	5,5%
nr. 1956	44	294,1	14,0	4,8%	18,0	6,2%	22,8	7,8%
nr. 1940	44	501,4	27,7	5,7%	20,9	4,3%	34,7	7,1%

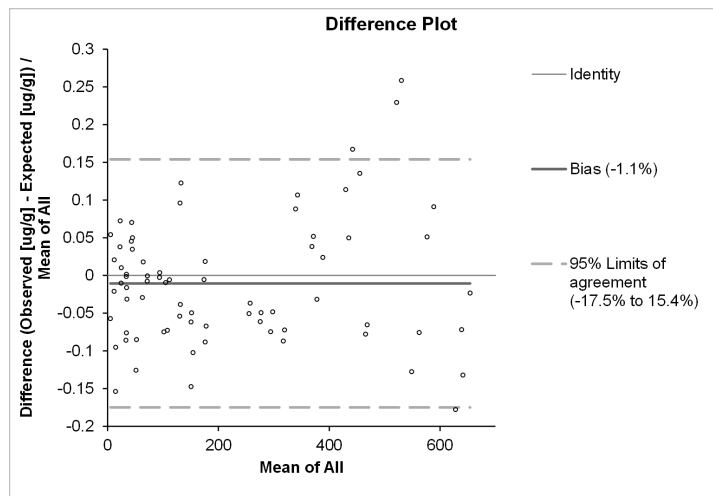
Tabell 13

Linearitet

ID	Måling områdetestet	R ²	p-verdi for ikke-lineær koeffisient	Lineært område
S1	2,3–740,0	0,972	p > 0,05	3,1–602,8
S2	5,1–999,5	0,988	p < 0,05	5,1–654,0
S3	1,3–690,2	0,994	p < 0,05	3,9–690,2
S4	9,6–827	0,940	p < 0,05	9,6–658,7

Tabell 14

Spiking Recovery



Figur 2

TABELLER OG FIGURER

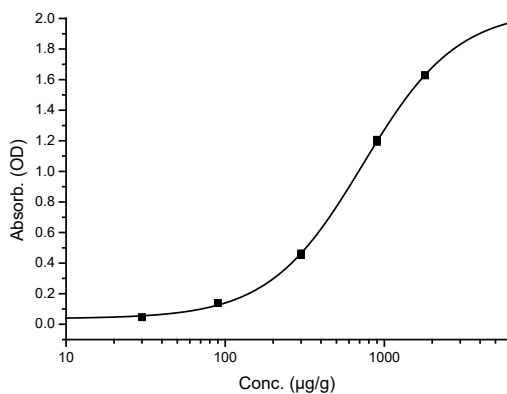
UTVIDET VIRKNINGSOMRÅDE 30–1800 µg/g

Eksempel på resultater

	Konsentrasjon [µg/g]	Absorpsjon [OD]
Kalibrator A	30	0,047
	30	0,046
Kalibrator B	90	0,138
	90	0,140
Kalibrator C	300	0,464
	300	0,452
Kalibrator D	900	1,207
	900	1,192
Kalibrator E	1800	1,627
	1800	1,630
Blank gj.sn.		0,057
Kontroll lav		0,147 0,162
Kontroll høy		0,618 0,618

Tabell 15

Eksempel på en standardkurve



Figur 3

Presisjon innenfor laboratorium

ID	Gj.snitt [µg/g]	n	Repete- barhet		Mellom kjøringer		Mellom dager		Innenfor laboratorium	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
P1	38,5	80	2,3	5,8%	1,8	4,8%	2,2	5,6%	3,6	9,4%
P2	67,0	80	2,0	3,0%	3,5	5,2%	1,6	2,4%	4,3	6,4%
P3	135,7	80	2,3	1,7%	5,6	4,1%	0,0	0,0%	6,0	4,4%
P4	207,1	80	4,1	2,0%	12,5	6,0%	0,0	0,0%	13,2	6,4%
P5	337,1	80	5,9	1,8%	18,3	5,4%	0,0	0,0%	19,3	5,7%
P6	562,6	80	11,0	2,0%	13,6	2,4%	2,5	0,4%	17,7	3,1%
P7	918,0	80	18,6	2,0%	62,1	6,8%	20,8	2,3%	68,1	7,4%

Tabell 16

Presisjon mellom partier

ID	Gj.snitt [µg/g]	n	Innenfor kjøring		Mellom dager		Mellom partier		Total	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
2	46,4	74	2,5	5,5%	0,5	1,1%	2,4	5,3%	4,5	9,7%
3	105,5	75	2,5	2,4%	1,4	1,4%	2,1	2,0%	4,5	4,2%
4	133,6	75	5,0	3,8%	1,9	1,4%	4,2	3,2%	7,2	5,4%
5	178,5	75	6,3	3,5%	0,0	0,0%	6,3	3,5%	9,2	5,2%
6	435,2	75	12,4	2,9%	7,5	1,7%	18,1	4,2%	23,2	5,3%
7	1476,1	75	48,4	3,3%	88,6	6,0%	31,4	2,1%	110,6	7,5%

Tabell 17

Reproduserbarhet – flersenterstudie av presisjonsevaluering

ID	Gj.snitt [µg/g]	n	Mellom operatører		Mellom steder		Total (Reprodu- serbarhet)	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
S01	42,1	236	0,0	0,0%	4,4	10,4%	8,0	19,0%
S02	67,4	238	1,7	2,6%	3,9	5,7%	8,6	12,7%
S03	142,3	238	2,4	1,7%	4,0	2,8%	16,8	11,8%
S04	379,8	240	0,0	0,0%	13,7	3,6%	24,2	6,4%
S05	1053,3	238	39,5	3,8%	64,4	6,1%	97,3	9,2%

Tabell 18

Linearitet

ID	Måling områdetestet [µg/g]	R ²	p-verdi for ikke-lineær koeffisient	Lineært område [µg/g]
FRB	22,8–1932,0	0,998	p < 0,05	24,6–1932,0
FRC	26,2–2096,2	0,997	p < 0,05	26,2–2096,2

Tabell 19

Nøyaktighet/recovery

ID	Gj.sn. baseline [µg/g]	Forventet baseline + forsterkning [µg/g]	Observert baseline + forsterkning [µg/g]	Bedringsrate [%]
#1	46,5	226,5	224,5	99,1%
#2	63,7	243,7	247,7	101,6%
#3	89,0	269,0	274,9	102,2%
#4	111,6	291,6	292,0	100,1%
#5	163,5	343,5	331,1	96,4%
#6	304,0	484,0	475,0	98,1%
#7	990,2	1170,2	1166,6	99,7%

Tabell 20

TABELLER OG FIGURER

YTELSESEGENSKAPER – PREANALYS

Ekstraksjonens reproduserbarhet – manuell
veieekstraksjon:

ID	Gj.snitt [µg/g]	n	Innenfor ekstraksjon		Mellom ekstraksjoner		Total presisjon	
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
S01	51,2	20	4,5	8,9%	7,8	15,2%	9,0	17,6%
S03	88,3	20	6,6	7,5%	13,3	15,0%	14,8	16,8%
S05	66,8	20	10,6	15,8%	3,7	5,5%	11,2	16,7%
S06	179,3	20	16,8	9,4%	32,8	18,3%	36,8	20,5%
S07	366,1	20	22,4	6,1%	32,3	8,8%	39,3	10,7%
S08	327,4	20	15,4	4,7%	26,9	8,2%	31,0	9,5%
S09	1783,7	20	198,3	11,1%	262,0	14,7%	328,6	18,4%

Tabell 21

Ekstraksjonens reproduserbarhet – CALEX® Cap

ID	Gj.snitt [µg/g]	Innenfor ekstraksjon		Mellom ekstraksjoner		Mellom partier		Total presisjon	
		SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
A	42,5	1,6	3,9%	5,2	12,1%	0,0	0,0%	5,4	12,7%
B	126,5	3,2	2,5%	9,6	7,6%	9,3	7,4%	13,8	10,9%
C	207,4	5,1	2,4%	34,8	16,8%	0,0	0,0%	35,1	16,9%
D	515,5	13,9	2,7%	38,2	7,4%	0,0	0,0%	40,7	7,9%
E	2949,9	93,0	3,2%	214,6	7,3%	47,0	1,6%	238,6	8,1%

Tabell 22

Metodesammenligning CALEX® Cap ekstraksjon og manuell ekstraksjon

Bland-Altman-analyse		
Gj.snittlig skjevhet (95 %)	Nedre LoA (95 % KI)	Øvre LoA (95 % KI)
10,1% (5,7%, 14,5%)	-47,4% (-54,9%, -39,8%)	67,5% (60,1%, 75,1%)

Tabell 23

Passing-Bablok regresjonsanalyse				
Helling (95 % KI)	Inngrep (µg/g) (95 % KI)	Skjevhet ved 80 µg/g (95 % KI)	Skjevhet ved 160 µg/g (95 % KI)	r
1,181 (1,120, 1,235)	-9,7 (-16,0, -2,4)	5,9% (1,4%, 12,2%)	12,0% (7,8%, 16,9%)	0,948

Tabell 24

FORSTYRRENDE STOFFER

Orale farmasøytika, kosttilskudd og hemoglobin

Handelsnavn	Virkestoff	Konsentrasjon mg/50 avføring
gyno-Tardyferon	Jern (II)-sulfat (inneholder 0,35 mg folsyre)	0,11
Prednison	Prednison	0,31
Imurek	Azatioprin	0,19
Salofalk	Mesalamin; 5-ASA	5,21
Agopton	Lansoprazol	0,18
Asacol	Mesalamin; 5-ASA	2,50
Vancocin	Vancomycin	2,00
Sulfametoksazol	Sulfametoksazol	1,60
Trimetoprim	Trimetoprimlaktat	0,35
Ciproksin	Ciprofloksacin	1,25
Vitamin E	DL-α-tokoferolacetat	0,30
Bion 3	3 probiotika (107 CFU): <i>Lactobacillus gasseri</i> PA16 / 8, <i>bifidobacterium bifidum</i> MF 20/5, <i>bifidobacterium longum</i> SP07 / 3, 12 vitaminer: A (800 µg), B1 (1,4 mg), B2 (1,6 mg), B6 (2 mg), B12 (1 µg), C (60 mg), D (5 µg), E (10 mg), biotin (150 µg), folsyre (200 µg), niacin (18 mg), pantotensyre (6 mg) og 7 mineraler: jod (100 µg), jern (5 mg), sink (5 mg), selen (30 µg), krom (25 µg), mangan (1,2 mg), molybdenum (25 µg)	1,06
Hemoglobin	Hemoglobin	1,25

Tabell 25

Enteropatologiske mikroorganismer

Navn	Endelig konsentrasjon (CFU/mL avføringsekstrakt)
<i>Escherichia coli</i>	9,5 x 10 ⁷
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	1 x 10 ⁹
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumonia</i>	5,4 x 10 ⁷
<i>Citrobacter freundii</i>	9,7 x 10 ⁷
<i>Shigella flexneri</i>	1,5 x 10 ⁸
<i>Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica</i>	1,6 x 10 ⁸

Tabell 26

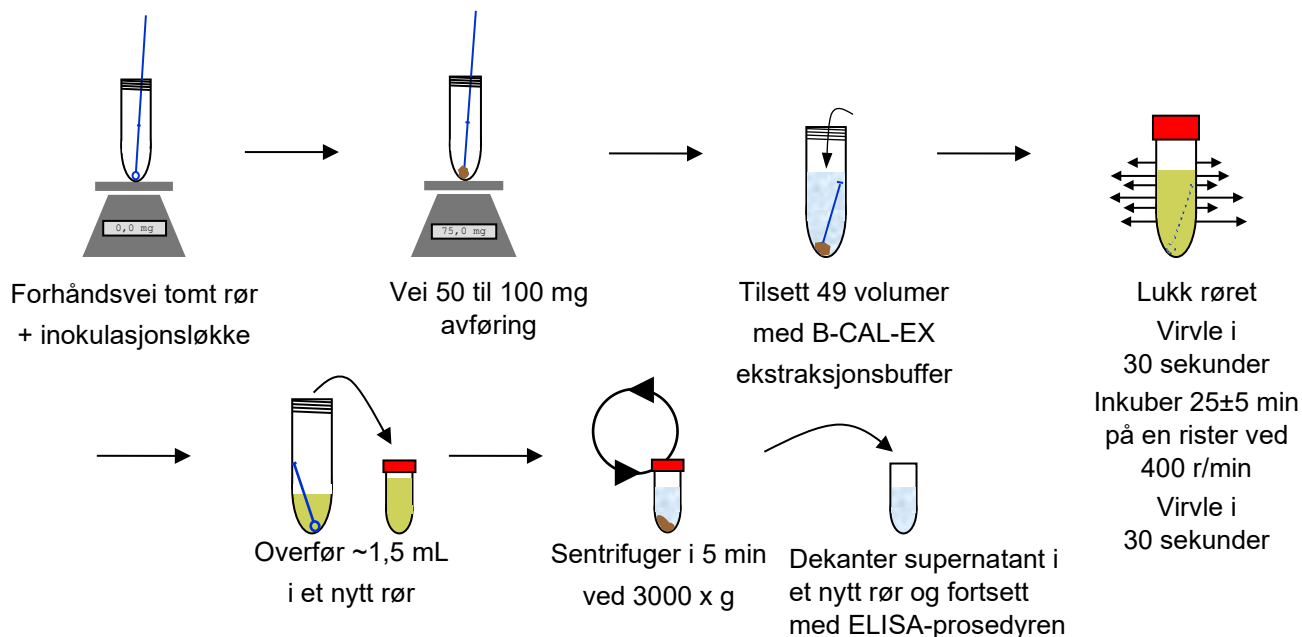
REFERANSER

1. Fagerhol MK: *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality*. Lancet 356, 1783-4 (2000)
2. Tibble JA et al.: *A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease*. Gut 47, 506-513 (2000)
3. Tibble JA et al.: *Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease*. Gastroenterol 123, 450-460 (2002)
4. Jahnsen J, Røseth AG, Aadland E. *Measurement of calprotectin in faeces.*: Tidsskr Nor Legeforen 128, 743-5 (2008)
5. Manz M et al.: *Value of fecal calprotectin in the evaluation of patients with abdominal discomfort: an observational study*. BMC Gastroenterology 12, 5 (2012)
6. Pavlidis P. et al.: *Diagnostic accuracy and clinical application of faecal calprotectin in adult patients presenting with gastrointestinal symptoms in primary care*. Scand J Gastroenterol. 48, 1048-54 (2013)
7. Konikoff MR and Denson LA: *Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis 12(6), 524-34 (2006)
8. Lin JF et al.: *Meta-analysis: fecal calprotectin for assessment of inflammatory bowel disease activity*. Inflamm Bowel Dis. Aug;20(8), 1407-15 (2014)
9. Lobatón T et al.: *A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease*. J Crohns Coliti, 7(12), 641-51 (2013)
10. Lobatón T et al.: *A new rapid quantitative test for fecal calprotectin predicts endoscopic activity in ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis. 19(5), 1034-42 (2013)
11. Wright EK et al.: *Measurement of fecal calprotectin improves monitoring and detection of recurrence of Crohn's disease after surgery*. Gastroenterology. 148(5), 938-947 (2015)
12. Naismith GD et al.: *A prospective evaluation of the predictive value of faecal calprotectin in quiescent Crohn's disease*. J Crohns Colitis. 8, 1022-9 (2014)
13. Ferreira-Iglesias R et al.: *Usefulness of a rapid faecal calprotectin test to predict relapse in Crohn's disease patients on maintenance treatment with adalimumab*. Scand J Gastroenterol. 23, 1-6 (2015)
14. Ferreira-Iglesias R1 et al.: *Fecal calprotectin as Predictor of Relapse in Patients with Inflammatory Bowel Disease Under Maintenance Infliximab Therapy*. J Clin Gastroenterol. 50(2), 147-51 (2015)
15. Guardiola J. et al.: *Fecal Level of calprotectin Identifies Histologic Inflammation in Patients with Ulcerative Colitis in Clinical and Endoscopic Remission*. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 12(11), 1865-70 (2014)
16. Lasson A et al.: *Pharmacological intervention based on fecal calprotectin levels in patients with ulcerative colitis at high risk of a relapse: A prospective, randomized, controlled study*. United European Gastroenterol J. 3(1), 72-9 (2015)
17. Bressler B et al.: *Clinicians' guide to the use of fecal calprotectin to identify and monitor disease activity in inflammatory bowel disease*. Can J Gastroenterol Hepatol. 29(7), 369-72 (2015)
18. Peyrin-BL et al.: *Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease (STRIDE): Determining Therapeutic Goals for Treat-to-Target*. Am J Gastroenterol. 110, 1324-38 (2015)
19. Molander P et al.: *Does Fecal calprotectin Predict Short-Term Relapse After Stopping Tnfalpha-Blocking Agents in Inflammatory Bowel Disease Patients in Deep Remission?* Journal of Crohn's and Colitis, 33-40 (2015)
20. De Vos M et al.: *Consecutive fecal calprotectin measurements to predict relapse in patients with ulcerative colitis receiving infliximab maintenance therapy*. Inflamm Bowel Dis. 19, 2111-2117 (2013)
21. Fagerberg UL et al.: *Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 40, 450-5 (2005)
22. Li F. et al.: *Fecal Calprotectin Concentrations in Healthy Children Aged 1-18 Months*. PLoS ONE 10(3) (2015)
23. Zhu Q. et al.: *Fecal Calprotectin in Healthy Children Aged 1-4 Years*. PLoS ONE 11 (3) (2016)
24. Peura S. et al.: *Normal values for calprotectin in stool samples of infants from the population-based longitudinal born into life study*. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 78(1-2), 120-124 (2018)

KORT PROTOKOLL

KALPROTEKTINEKSTRAKT

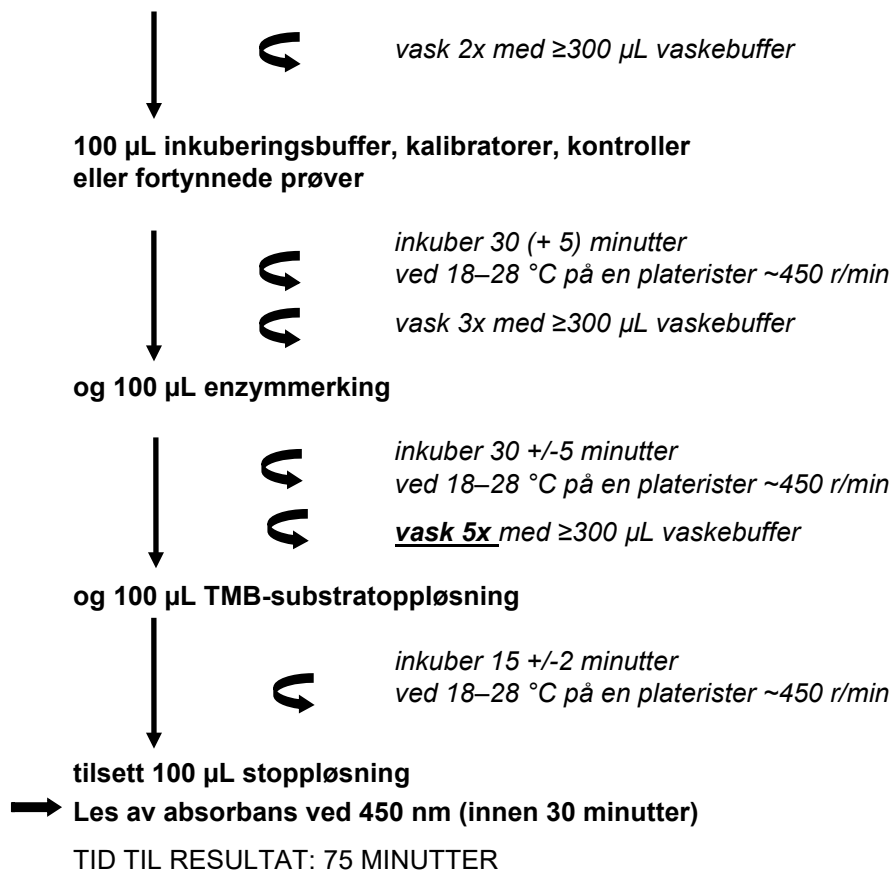
Manuell ekstraksjonsprosedyre



KORT PROTOKOLL

KALPROTEKTIN ELISA

Forhåndsbelagt mikrotiterplate



ENDRINGSLOGG

Dato	Versjon	Endring
2022-MM-DD	A3	Oppdatering av kapittelet <i>Advarsler og forsiktighetsregler</i> Inkludert usikkerhetsverdier for kalibratorer og begrunnelse for intern standardisering i kapitlet <i>Standardisering</i> Oppdatert ordlyd og forenkling i kapittel <i>Ytelsesegenskaper</i> Revisjon av kapittel <i>Symboler</i> Ny patentinformasjon Inkludert kontrollorgannummer i CE-merke – prosedyre for konformitetsvurdering i henhold til IVDR 2017/746

HENDELSESRAPPORTERING I EU-MEDLEMSSTATER

Dersom det har oppstått en alvorlig hendelse i forbindelse med denne enheten, skal den rapporteres så snart som mulig til produsenten og til kompetent myndighet i medlemsstaten.

TRANSPORTSKADE

Varsle din distributør dersom dette produktet var skadet ved mottak.

SYMBOLER

BÜHLMANN bruker symboler og skilt oppført og beskrevet i ISO 15223-1. I tillegg brukes følgende symboler og tegn:

Symbol	Explanation
MP	Mikrotiterplate
BUF EX	Ekstraksjonsbuffer
BUF WASH 10X	Vaskebufferkonsentrat (10x)
BUF INC	Inkuberingsbuffer
CAL A – CAL E	Kalibrator A -E
CONTROL L	Kontroll lav
CONTROL H	Kontroll høy
EL	Enzymmerking
SUBS TMB	TMB substrat
SOLN STOP	Stoppløsning

Deler av settet er patentbeskyttet av EP2947459(B1); US10620216(B2); AU2015261919(B2); JP6467436(B2)

